

(19) 世界知的所有権機関
国際事務局



(43) 国際公開日
2003 年 8 月 7 日 (07.08.2003)

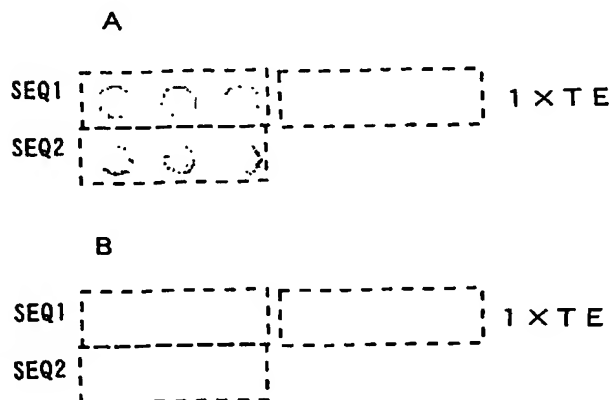
PCT

(10) 国際公開番号
WO 03/065040 A1

- (51) 国際特許分類⁷: G01N 33/53, (72) 発明者; および
37/00, C12N 15/00, C12Q 1/68 (75) 発明者/出願人 (米国についてのみ): 小田 竜一
(ODA, Ryuichi) [JP/JP]; 〒267-0056 千葉県 千葉市 緑
(21) 国際出願番号: PCT/JP03/01006 区大野台 1-2-3 日清紡績株式会社 研究開発セン
ター内 Chiba (JP). 木村 直紀 (KIMURA, Naoki) [JP/JP];
(22) 国際出願日: 2003 年 1 月 31 日 (31.01.2003) 〒267-0056 千葉県 千葉市 緑区大野台 1-2-3 日清
紡績株式会社 研究開発センター内 Chiba (JP).
(25) 国際出願の言語: 日本語
(26) 国際公開の言語: 日本語 (74) 代理人: 遠山 勉, 外 (TOYAMA, Tsutomu et al.); 〒
103-0004 東京都 中央区 東日本橋 3 丁目 4 番 10 号
ヨコヤマビル 6 階 Tokyo (JP).
(30) 優先権データ: 特願 2002-25622 2002 年 2 月 1 日 (01.02.2002) JP
特願 2002-242456 2002 年 8 月 22 日 (22.08.2002) JP (81) 指定国 (国内): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB,
BG, BR, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK,
DM, DZ, EC, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU,
ID, IL, IN, IS, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT,
LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NO, NZ,
OM, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, TJ,
[続葉有]

(54) Title: METHOD OF FIXING BIOMOLECULE TO CARRIER

(54) 発明の名称: 生体分子の担体への固定法



(57) Abstract: A nucleic acid is fixed to a carrier made of a synthetic resin (for example, polycarbonate, polymethyl methacrylate, acrylonitrile-butadiene-styrene copolymer, polyethylene, polyethylene terephthalate, polyphenol, polystyrene, polyacrylonitrile, polyvinyl chloride or aramid) by spotting a solution of the nucleic acid on the carrier, drying the solution and then irradiating the carrier with UV rays containing a component of a wavelength of 280 nm preferably in a dose of 100 mJ/cm² or more.

(57) 要約:

核酸の溶液を、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリフェノール、ポリスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリ塩化ビニル、及びアラミド等の合成樹脂からなる担体上にスポットし、同溶液を乾燥させ、担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を好ましくは 100 mJ/cm² 以上照射することにより、前記担体に核酸を固定する。



WO 03/065040 A1



TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA,
ZM, ZW.

添付公開書類:

— 国際調査報告書

- (84) 指定国 (広域): ARIPO 特許 (GH, GM, KE, LS, MW, MZ, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), ユーラシア特許 (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), ヨーロッパ特許 (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE, SI, SK, TR), OAPI 特許 (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

2文字コード及び他の略語については、定期発行される各PCTガゼットの巻頭に掲載されている「コードと略語のガイダンスノート」を参照。

明細書

生体分子の担体への固定法

技術分野

本発明は、核酸等の生体分子を担体に固定化する方法に関する。本発明の方法は、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析等の操作に有用である。

背景技術

従来、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析や、イムノアッセイ等においては、核酸やタンパク質を膜や平板などの担体に固定化する技術が利用されている。このような生体分子の固定化法として、核酸では、以下のものが知られている。

(1) 5' 末端にチオール基を有する核酸とチオール基を含むビーズ状基材間のジスルフィド結合による固定 (P. J. R. Day, P. S. Flora, J. E. Fox, M. R. Walker, *Biochem. J.*, 278, 735-740 (1991)) 等のような、修飾基を導入した核酸を化学結合させる方法。

(2) 核酸を、紫外線 (UV) 照射又は加熱処理により、ニトロセルロース、ナイロンメンブレン、又はポリリジン等のカチオンポリマーで被覆されたガラス等の担体等に、吸着固定させる方法 (J. Sambrook, E. F. Fritsch and T. Maniatis, *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory Pres, Second Edition, pages 2.109-2.113 and pages 9.34-9.46、特表平10-503841号)。

(3) ポリリジン溶液で処理されたマイクロプレートのウェル中に核酸を注入し、37℃に加熱することにより、物理吸着させることにより固定する方法 (G. C. N. Parry and A. D. B. Malcom, *Biochem. Soc. Trans.*, 17, 230-231 (1989))。

(4) 基材上に結合させたヌクレオチドを用い、基材上でDNAを合成する方法 (W097/10365)。

(5) カルボジイミド基を有する高分子化合物を担持させたガラス等の基材に核酸を固定する方法 (特開平8-23975)。

しかし、上記の(1)の方法は、極めて特殊な機械と試薬を必要とする。また、

(2) 及び (3) の方法においては、ハイブリダイゼーションを行った場合、特に操作過程で担体から核酸が剥がれ落ち、結果として検出感度が下がったり、再現性が得られない等の欠点がある。また、この方法では、長い核酸は固定できるが、オリゴマー等約 50 mer 以下の短い核酸になると、効率よく固定化できないという欠点がある。尚、これらの方法では、UV 照射量は数十 mJ/cm^2 程度である。さらに、(4) の方法は、基材上で DNA を合成するために、極めて特殊な機械と試薬を必要とし、さらに、合成できる核酸も 25 mer 程度までに限られるという欠点がある。また、(5) の方法は、基材の材料が限られ、表面のコーティング工程が必要である。

ところで、ポリスチレンフィルムに真空紫外線を照射して、表面を親水化する技術が報告されている（穂積ら、「表面技術」vol.52, No.12, p.97-98, 2001）。しかし、波長 280nm 程度の紫外線の照射によって、核酸を合成樹脂担体に固定化することができることは、開示されていない。

発明の開示

本発明は、上記従来技術の状況に鑑み、生体分子、例えば核酸、特に短鎖長の核酸を担体に、簡便、かつ、効率よく固定する方法を提供することを課題とする。

本発明者は、上記課題を解決するために鋭意検討を行った結果、核酸溶液を合成樹脂製の担体上にスポットした後に、紫外線を担体に照射することによって、核酸を担体に効率よく固定化することができることを見い出し、本発明を完成するに至った。

すなわち本発明は、以下のとおりである。

(1) 生体分子を担体に固定化する方法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を照射する工程を含み、前記担体は合成樹脂製であることを特徴とする方法。

(2) 前記合成樹脂は、熱可塑性樹脂、熱硬化性樹脂及び共重合体から選ばれる (1) に記載の方法。

(3) 前記合成樹脂が、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリフェノール、ポリスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリ塩化ビニル、及びアラミドから選ばれる(2)に記載の方法。

(4) 前記紫外線の照射量は $100 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ 以上である(1)～(3)のいずれかに記載の方法。

(5) 前記生体分子は核酸、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド、酵素から選ばれる(1)～(4)のいずれかに記載の方法。

(6) 生体分子が担体上に固定化された生体分子固定化担体の製造法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を照射し、前記生体分子を担体に固定化する工程を含む方法。

(7) 前記生体分子は核酸であって、核酸固定化担体はハイブリダイゼーションによる核酸の分析に用いられるものである(6)に記載の方法。

以下、本発明を詳細に説明する。

本発明に用いる担体は、生体分子を固定化するためのものであり、合成樹脂製であることを特徴とする。合成樹脂としては、紫外線照射により生体分子を固定化することができるものであれば特に制限されず、具体的には、熱可塑性樹脂、熱硬化性樹脂及び共重合体等を挙げることができる。

より具体的には、熱可塑性樹脂としては、アイオノマー（スチレン系、オレフィン系）、ポリノルボルネン、ポリアセタール、ポリアリレート、ポリエーテルエーテルケトン、ポリエチレンオキサイド、ポリオキシメチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリカーボネート、ポリスチレン、ポリスルホン、ポリパラメチルスチレン、ポリアリルアミン、ポリフェニレンエーテル、ポリフェニレンサルファイド、ポリブタジエン、ポリブチレンテレフタレート、ポリプロピレン、ポリメチルペンテン、ポリエーテルスルホン、ポリフェニレンスルフィド、ポリオキシベンゾイル、ポリオキシエチレン、酢酸セルロース、ポリジメチルシロキサン、ポリイソブチレン、セルローストリアセテート、ポリ-p-フェニレンテ

レフタラミド、ポリイソブレン、ポリアクリロニトリル、ポリメチルペンテン、塩素プラスチック（ポリ塩化ビニル、ポリ塩化エチレン、塩素化ポリプロピレン、ポリ塩化ビニリデン）、フッ素プラスチック（テトラフルオロエチレン、ポリクロロトリフルオロエチレン、ポリフッ化ビニリデン）、ポリアミド（ナイロン6、ナイロン66）、ポリアミドイミド、ポリイミド（熱可塑性ポリイミド、ポリエーテルイミド）、ポリエチレンプラスチック（塩素化、高密度、低密度）、ポリビニルプラスチック（ポリ塩化ビニル、ポリ酢酸ビニル、ポリパラビニルフェノール、ポリビニルアルコール、ポリビニルエーテル、ポリビニルブチラール、ポリビニルホルマール）、液晶ポリマー（ポリエステル系液晶高分子）、アクリレートプラスチック（アミノポリアクリルアミド、ポリアクリル酸メチル、ポリメチルメタクリレート、エチルポリメタクリレート、ブチルポリメタクリレート）、熱可塑性エラストマー（スチレン系、オレフィン系、ウレタン系、ポリエステル系、ポリアミド系、1, 2-ポリブタジエン系、塩化ビニル系、フッ素系、ポリアイオノマー系、塩素化ポリエチレン系、シリコーン系）等が挙げられる。

また、熱硬化性樹脂としては、エポキシ、ポリキシレン、ポリグアナミン、ポリジアリルフタレート、ポリビニルエステル、ポリフェノール、不飽和ポリエステル、ポリフラン、ポリイミド、ポリウレタン、ポリマレイン酸、メラミン、ユリア、アルキド、ベンゾグアナミン、ポリシアナート、ポリイソシアナート等が挙げられる。

さらに、共重合体としては、イソブチレン無水マレイン酸共重合体、アクリロニトリルアクリレートスチレン共重合体、アクリロニトリルEPDMスチレン共重合体、アクリロニトリルスチレン共重合体、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、ブタジエンスチレンメチルメタクリレート共重合体、エチレン塩化ビニル共重合体、エチレン酢酸ビニル共重合体、エチレン-エチルアクリレート共重合体、アクリロニトリル-ブタジエンスチレン共重合体、ポリエーテルエーテルケトン共重合体、フッ化エチレンポリプロピレン共重合体、テトラフルオロエチレンパーフロロアルキルビニルエーテル共重合体、テトラフルオロエチレンエチレン共重合体等が挙げられる。

上記の合成樹脂のうち、特に好ましいものとしては、ポリカーボネート、ポリ

メチルメタクリレート、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリフェノール、ポリスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリ塩化ビニル、アラミド等が挙げられる。

また、上記合成樹脂に、染料、発色剤、可塑剤、顔料、重合禁止剤、表面改質剤、安定剤、密着性付与剤、熱硬化剤、分散剤、紫外線劣化防止剤等を必要に応じて添加した合成樹脂を用いることができる。さらに、前記合成樹脂は、形状を保持するために異なる種類の前記合成樹脂が積層しても良く、単一合成樹脂であっても良い。また、前記合成樹脂を2種類以上混合したポリマーアロイであっても良い。さらに、上記合成樹脂に、葉脈繊維、果実繊維、獣毛繊維、繭繊維、羽毛繊維、キチン、キトサン、石綿（アスベスト）等の線維を混合してもよい。

上記担体の形状は、特に問われないが、繊維状、平板状、フィルター状、ビーズ状等が挙げられる。また、マイクロタイタープレートのような形状であってもよい。さらに、得られる結果の保存を容易にするため、平板等の裏面をシール等を使用できる材料（接着剤等）を塗布、コート等を行うことによって、シールとしても使用することもできる。

上記担体の所定の位置に、生体分子の溶液をスポットする。生体分子としては、核酸、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド、酵素などが挙げられる。以下、生体分子として核酸を例として説明するが、固定の際に紫外線を照射する以外は、他の物質でも通常固定化に用いられている方法や条件を採用することができる。

核酸としては、通常の固相化核酸を用いた核酸同士のハイブリダイゼーションに用いられる固相化核酸と特に変わるところはなく、ハイブリダイゼーションが可能な核酸であれば特に制限されず、例えば、天然又は合成のDNA（オリゴヌクレオチドを含む）もしくはRNA（オリゴヌクレオチドを含む）が挙げられる。また、上記核酸は1本鎖であっても、2本鎖であっても構わない。核酸の鎖長は、ハイブリダイゼーションが可能な長さであれば特に制限されないが、通常5～50000塩基、好ましくは20～10000塩基である。また、核酸の5'末端あるいは3'末端にチミジン等、紫外線によって反応活性基を有するオリゴヌクレオチドの重合体を有しても良い。

核酸を溶解する溶媒も特に制限されず、蒸留水、又は通常核酸溶液の調製に用

いられる緩衝液、例えばTE緩衝液（10mM Tris塩酸，pH8.0／1mM EDTA）等のTris緩衝液、食塩を含む水溶液、カルボン酸塩を含む水溶液（クエン酸ナトリウム、クエン酸アンモニウム、酢酸ナトリウム等）、スルホン酸塩を含む水溶液（ドデシル硫酸ナトリウム、ドデシル硫酸アンモニウム等）、ホスホン酸塩を含む水溶液等（リン酸ナトリウム、リン酸アンモニウム等）等を挙げることができる。また、一般に市販されている溶媒、Micro Spotting Solution (TeleChem International, Inc. 社製) 等も挙げることができる。また、核酸溶液の濃度も特に制限されないが、通常1mmol/ml～1fmol/ml、好ましくは100pmol/ml～100fmol/mlの濃度である。

核酸溶液を担体上にスポットする方法としては、ピペットで核酸溶液を担体上に滴下する方法、又は市販のスポットを用いる方法等が挙げられる。スポットの形状及びスポット量としては、核酸溶液をスポットした位置を把握することができる程度であれば、特に制限されないが、形状としては点状又は円状が好ましい。また、好ましいスポット量は10nl～10mlである。核酸溶液は、担体上に1箇所又は複数箇所にスポットされる。スポットされる核酸溶液は、1種類でも2種類又はそれ以上であってもよい。尚、担体に核酸が固定されたことを示す陽性コントロールとして、標識した核酸を固定化しておいてもよい。

本発明の好ましい形態においては、核酸溶液を担体上にスポットした後に、280nmの波長を含む紫外線を照射することである。また、前記核酸溶液をスポット後紫外線照射前に乾燥させることができる。前記核酸溶液の乾燥方法としては、自然に乾燥させてもよく、加熱して乾燥させてもよい。加熱する場合の温度は、通常30～100℃、好ましくは35～45℃である。

次に、担体、少なくとも担体の核酸を固定した部位に、波長280nmの成分を含む紫外線を照射する。具体的には、波長280nmを含むブロードな波形を有する紫外線であっても良い。照射量は、累積照射量として通常100mJ/cm²以上、好ましくは200mJ/cm²以上である。

上記のようにして、核酸を担体上に固定化することにより、核酸固定化担体が製造される。本発明の方法により得られる核酸固定化担体は、例えば、ハイブリダイゼーションによる核酸の分析に用いることができる。本発明の方法により担

体に固定化された核酸は、通常のハイブリダイゼーションの条件下で担体から脱離しにくいいため、紫外線照射を行わない場合に比べて検出感度が良好で、再現性も良い。ハイブリダイゼーション及びその検出は、通常の固相化核酸を用いたハイブリダイゼーションと同様にして行うことができる。

本発明では、核酸を固定化するのに用いる担体として、安価な合成樹脂を用いているため、低コスト化が可能である。また、合成樹脂は軽量で形成が容易なため、様々な形態のDNAマイクロアレイの作製が容易となる。また、長期保存が可能であり、保存安定性に優れている。さらに、本発明の方法は、担体表面のコーティング工程が不要であり、操作が簡便である。

図面の簡単な説明

図1は、実施例で作製したオリゴヌクレオチド固定化平板を用いたハイブリダイゼーションの結果を示す図（写真）である。A：実施例1 B：比較例1

SEQ1：配列番号1 SEQ2：配列番号2 点線は、オリゴヌクレオチドを固定化した領域、及びコントロールである1×TE緩衝液をスポットした領域を示す。

発明を実施するための最良の形態

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

実施例1 核酸の平板への固定化

常法に従い、オリゴヌクレオチド合成機（Perkin-elmer Applied biosystems）を用いて、配列番号1、2に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（21mer）を合成した。また、プローブとして、配列番号3に示す塩基配列を有するDNA（262bp）を調製した。尚、配列番号1に示すオリゴヌクレオチド及びプローブは、5'末端をビオチン化した。また、配列番号2に示すオリゴヌクレオチドはビオチン化プローブと相補性を持っている。これらのオリゴヌクレオチドを1p mol/μlになるように1×TE緩衝液（10mM Tris塩酸，pH 8/1mM EDTA）に溶解した。

市販品のポリ（メチルメタクリレート）製の平板の所定の位置に、上記オリゴ

ヌクレオチド溶液それぞれを、3箇所ずつスポットした(図1)。スポットの量は $0.5\mu\text{l}$ ずつであり、スポットの大きさは直径約1mmであった。この平板を乾燥機に入れ、 42°C で20分乾燥した。次にUvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製)を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射した。照射時間は80秒であった。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液(1×TE緩衝液)も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

比較例1

予め、ポリ(メチルメタクリレート)製の平板に、Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製)を用い、波長280nmを含むnmの紫外線を16cmの距離から $200\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射した。実施例1に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、ポリ(メチルメタクリレート)製の平板の所定の位置に、3箇所ずつスポットした(図1)。スポットの量は $0.5\mu\text{l}$ ずつであり、スポットの大きさは直径約1mmであった。照射時間は80秒であった。この平板を乾燥機に入れ 42°C で20分乾燥した。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液(1×TE緩衝液)も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

実施例2 ハイブリダイゼーション及びその検出

(1) ハイブリダイゼーション

実施例1及び比較例1のオリゴヌクレオチド固定化平板の核酸を固定化した部分に、 3pmol ビオチン化プローブ(262bp)を含むハイブリダイゼーション溶液(Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.)) $60\mu\text{l}$ をのせ、平板を水が浸入しないケース(ハイブリカセット)に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、 45°C で2時間加熱した。

(2) ポストハイブリダイゼーション

上記ハイブリダイゼーションの後、以下の条件でポストハイブリダイゼーショ

ン洗浄を行い、オリゴヌクレオチド固定化平板に非特異的に吸着したプローブを除去した。

〔ポストハイブリダイゼーション洗浄の条件〕

- 1) 2×SSC, 0.1%SDS; 室温、5分間、2回
- 2) 0.2×SSC, 0.1%SDS; 40℃、5分間、2回
- 3) 2×SSC; 室温 1分間、3回

(3) 平板に固定化されたオリゴヌクレオチド及びハイブリダイゼーションの検出

平板のハイブリダイゼーション溶液を乗せた部分に、乳タンパクを含むブロッキング溶液（ブロックエース 雪印乳業製）1.5mlをのせ、室温で30分間ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除いた後、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲート溶液（VECTOR社製）を1.5mlのせ、室温で30分間反応させた。つぎに、平板をTBST（50mM Tris-HCl(pH7.5), 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20）溶液に浸し、5分間振とうして反応しなかったコンジュゲートを除去した。最後に、平板のハイブリダイゼーション溶液を乗せた部分に基質溶液（TMB）を1.5mlのせて、30分間放置し、発色反応を行った。

その結果を、次に示す比較例1の結果とともに、表1に示す。表1中の記号の意味は、表2以下でも同様である。配列番号1のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルは固定化されたオリゴヌクレオチドの量を、配列番号2のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルはハイブリダイゼーションの強度を、それぞれ示す。

表 1

	固定化したオリゴヌクレオチド	
	配列番号 1	配列番号 2
実施例 1	◎	◎
比較例 1	×	×

◎：大部分のシグナルが非常に高感度かつ非常に明瞭に現れた。

○：大部分のシグナルが高感度かつ明瞭に現れた。

△：一部のシグナルが低感度または不明瞭に現れた。

×：大部分のシグナルが低感度または不明瞭に現れた。またはシグナルが全く現れなかった。

表 1 の結果から明らかなように、実施例 1 のオリゴヌクレオチド固定化平板は、比較例 1 のオリゴヌクレオチド固定化平板に比べて、オリゴヌクレオチドが確実に平板上に固定化されていることがわかる。また、実施例 1 のオリゴヌクレオチド固定化平板では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。なお、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にはシグナルはまったく現れなかった。

実施例 3 核酸の平板への固定化

常法に従い、オリゴヌクレオチド合成機（Perkin-elmer Applied biosystems）を用いて、配列番号 4、5 及び 6 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチド（31mer）を合成した。尚、配列番号 4 に示すオリゴヌクレオチドは、5' 末端をビオチン化した。また、配列番号 4 及び 5 に示すオリゴヌクレオチドは、実施例 1 に記載の配列番号 1 及び 2 に示すオリゴヌクレオチドの 5' 末端に 10 個のチミジンが連結した配列を有している。配列番号 5 のオリゴヌクレオチドは、前記ビオチン化プローブと相補性を持っており、配列番号 6 に示すオリゴヌクレオチドは、配列番号 5 に示すオリゴヌクレオチドと 1 塩基配列が異なるため相補性を持っていない。これらのオリゴヌクレオチドを 100pmol/μl になるように 3 × SSC に溶解した。

市販品のポリカーボネート製の平板の所定の位置に、上記オリゴヌクレオチド

溶液それぞれを、スポットター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて3箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約0.3mmであった。この平板を乾燥機に入れ、42℃で20分乾燥した。次にUvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製) を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から300mJ/cm²照射した。照射時間は120秒であった。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

比較例 2

予め、ポリカーボネート製の平板に、Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製) を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から300mJ/cm²照射した。実施例3に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、ポリカーボネート製の平板の所定の位置に、スポットター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて3箇所ずつスポットした。照射時間は120秒であった。この平板を乾燥機に入れ42℃で20分乾燥した。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

実施例 4 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例3及び比較例2のオリゴヌクレオチド固定化平板の核酸を固定化した部分に、3pmolピオチン化プローブ (262bp) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60μl) をのせ、平板を水が浸入しないケース (ハイブリカセット) に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で2時間加熱した。

以下、実施例2と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及び平板に固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を、次に示す比較例2の結果とともに、表2に示す。配列番号4のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルは固定化されたオリゴヌクレオチドの量を、配列番号5のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルはハイブ

リダイゼーションの強度を、それぞれ示す。

表 2

	固定化したオリゴヌクレオチド		
	配列番号 4	配列番号 5	配列番号 6
実施例 3	◎	◎	×
比較例 2	×	×	×

表 2 の結果から明らかなように、実施例 3 のオリゴヌクレオチド固定化平板は、比較例 2 のオリゴヌクレオチド固定化平板に比べて、オリゴヌクレオチドが確実に平板上に固定化されていることがわかる。また、実施例 3 のオリゴヌクレオチド固定化平板では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。ここで、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）及び配列番号 6 にはシグナルはまったく現れなかった。

実施例 5 核酸の平板への固定化

アラミド不織布/テトロンクロス/アラミド不織布の 3 層（表面はアラミド不織布）から構成される平板（相模ビーシーアイ（株）社製）の所定の位置に、上記オリゴヌクレオチド溶液それぞれを、スポッター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて 3 箇所ずつスポットした。尚、テトロン（帝人（株）の登録商標）はポリエチレンテレフタレートである。スポットの大きさは直径約 0.3mm であった。この平板を乾燥機に入れ、42℃で 20 分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400（STRATAGENE 社製）を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から 400mJ/cm² 照射した。照射時間は 160 秒であった。その後、前記平板を水中で 30 分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE 緩衝液）も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

比較例 3

予め、アラミド不織布/テトロンクロス/アラミド不織布の3層（表面はアラミド不織布）から構成される平板（相模ピーシーアイ（株）社製）の平板に、Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製)を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から400mJ/cm²照射した。実施例3に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、アラミド不織布/テトロンクロス/アラミド不織布製の平板の所定の位置に、スプッター（Pyxis5500 CARTESIAN社製）を用いて3箇所ずつスポットした。照射時間は160秒であった。この平板を乾燥機に入れ42℃で20分乾燥した。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE緩衝液）も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

実施例6 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例5及び比較例3のオリゴヌクレオチド固定化平板の核酸を固定化した部分に、3pmolビオチン化プローブ（262bp）を含むハイブリダイゼーション溶液（Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60μlをのせ、平板を水が浸入しないケース（ハイブリカセット）に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で2時間加熱した。

以下、実施例2と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及び平板に固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を、次に示す比較例3の結果とともに、表3に示す。

表3

	固定化したオリゴヌクレオチド		
	配列番号4	配列番号5	配列番号6
実施例5	◎	◎	×
比較例3	×	×	×

表3の結果から明らかなように、実施例5のオリゴヌクレオチド固定化平板は、

比較例 3 のオリゴヌクレオチド固定化平板に比べて、オリゴヌクレオチドが確実に平板上に固定化されていることがわかる。また、実施例 5 のオリゴヌクレオチド固定化平板では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。ここで、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）及び配列番号 6 にはシグナルはまったく現れなかった。

実施例 6 核酸の平板への固定化

実施例 1 に記載の配列番号 1 及び 2 のオリゴヌクレオチドを 70 pmol/ μ l になるように 5×SSC 水溶液に溶解した。

市販のポリエチレン製平板の所定の位置に、上記オリゴヌクレオチド溶液それぞれを、スポットター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて 3 箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約 0.2 mm であった。この平板を乾燥機に入れ、42℃で 20 分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製) を用い、波長 280 nm を含む紫外線を 16 cm の距離から 250 mJ/cm² 照射した。照射時間は 100 秒であった。その後、前記平板を水中で 30 分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE 緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

比較例 4

予め、ポリエチレン製平板に、Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製) を用い、波長 280 nm を含む紫外線を 16 cm の距離から 250 mJ/cm² 照射した。実施例 6 に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、ポリエチレン製平板の所定の位置に、スポットター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて 3 箇所ずつスポットした。照射時間は 100 秒であった。この平板を乾燥機に入れ 42℃で 20 分乾燥した。その後、前記平板を水中で 30 分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE 緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

実施例 7 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例 6 及び比較例 4 のオリゴヌクレオチド固定化平板の核酸を固定化した部分に、3pmolピオチン化プローブ (262bp) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60 μ l) をのせ、平板を水が浸入しないケース (ハイブリカセット) に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で 2 時間加熱した。

以下、実施例 2 と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及び平板に固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を、次に示す比較例 4 の結果とともに、表 4 に示す。配列番号 1 のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルは固定化されたオリゴヌクレオチドの量を、配列番号 2 のオリゴヌクレオチドを固定化した位置のシグナルはハイブリダイゼーションの強度を、それぞれ示す。

表 4

	固定化したオリゴヌクレオチド	
	配列番号 1	配列番号 2
実施例 6	◎	◎
比較例 4	×	×

表 4 の結果から明らかなように、実施例 6 のオリゴヌクレオチド固定化平板は、比較例 4 のオリゴヌクレオチド固定化平板に比べて、オリゴヌクレオチドが確実に平板上に固定化されていることがわかる。また、実施例 6 のオリゴヌクレオチド固定化平板では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。ここで、コントロールの位置 (核酸を含まない溶液をスポットした箇所) にはシグナルはまったく現れなかった。

実施例 8 核酸の平板への固定化

市販のフェノール樹脂製平板の所定の位置に、実施例 6 に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、スポッター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて 3

箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約0.4mmであった。この平板を乾燥機に入れ、42℃で20分乾燥した。次にUvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製)を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から600mJ/cm²照射した。照射時間は240秒であった。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液(1×TE緩衝液)も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

比較例 5

予め、フェノール樹脂製平板に、Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製)を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から600mJ/cm²照射した。実施例6に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、ポリエチレン製平板の所定の位置に、スポットター(Pyxis5500 CARTESIAN社製)を用いて3箇所ずつスポットした。照射時間は240秒であった。この平板を乾燥機に入れ42℃で20分乾燥した。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液(1×TE緩衝液)も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

実施例 9 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例8及び比較例5のオリゴヌクレオチド固定化平板の核酸を固定化した部分に、5pmolピオチン化プローブ(262bp)を含むハイブリダイゼーション溶液(Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60mlをのせ、平板を水が浸入しないケース(ハイブリカセット)に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で2時間加熱した。

以下、実施例2と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及び平板に固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を、次に示す比較例5の結果とともに、表5に示す。

表 5

	固定化したオリゴヌクレオチド	
	配列番号 1	配列番号 2
実施例 8	◎	◎
比較例 5	×	×

表 5 の結果から明らかなように、実施例 8 のオリゴヌクレオチド固定化平板は、比較例 5 のオリゴヌクレオチド固定化平板に比べて、オリゴヌクレオチドが確実に平板上に固定化されていることがわかる。また、実施例 8 のオリゴヌクレオチド固定化平板では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。ここで、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にはシグナルはまったく現れなかった。

実施例 10 核酸の平板への固定化

市販のポリスチレン製平板の所定の位置に、実施例 6 に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、スポットター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて 3 箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約 0.4mm であった。この平板を乾燥機に入れ、42℃ で 20 分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE 社製) を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から 600mJ/cm² 照射した。照射時間は 240 秒であった。その後、前記平板を水中で 30 分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE 緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

比較例 6

予め、ポリスチレン製平板に、Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE 社製) を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から 600mJ/cm² 照射した。実施例 6 に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、ポリエチレン製平板の所定の位置に、スポットター (Pyxis5500 CARTESIAN 社製) を用いて 3 箇所ずつスポットした。

照射時間は240秒であった。この平板を乾燥機に入れ42℃で20分乾燥した。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE緩衝液）も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

実施例11 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例10及び比較例6のオリゴヌクレオチド固定化平板の核酸を固定化した部分に、3 pmolビオチン化プローブ（262bp）を含むハイブリダイゼーション溶液（Arrayit UniHyb（TeleChem International, Inc.）60μlをのせ、平板を水が浸入しないケース（ハイブリカセット）に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、45℃で2時間加熱した。

以下、実施例2と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及び平板に固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を、次に示す比較例6の結果とともに、表6に示す。

表 6

	固定化したオリゴヌクレオチド	
	配列番号 1	配列番号 2
実施例 10	◎	◎
比較例 6	×	×

表6の結果から明らかなように、実施例10のオリゴヌクレオチド固定化平板は、比較例6のオリゴヌクレオチド固定化平板に比べて、オリゴヌクレオチドが確実に平板上に固定化されていることがわかる。また、実施例10のオリゴヌクレオチド固定化平板では、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。ここで、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にはシグナルはまったく現れなかった。

実施例 1 2 核酸のマイクロタイタープレートへの固定化

ポリスチレン製 24 穴マイクロタイタープレート (NUNC (株) 社製) の所定の位置に、実施例 6 に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、3 箇所ずつスポットした。スポットの量は $0.5\mu\text{l}$ ずつであり、スポットの大きさは直径約 1mm であった。この平板を乾燥機に入れ、 42°C で 20 分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE 社製) を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から $1200\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射した。照射時間は 480 秒であった。その後、前記マイクロタイタープレートの所定の位置に水を 1ml 加え、30 分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 ($1\times\text{TE}$ 緩衝液) も同様にマイクロタイタープレートにスポットし、固定化の操作を行った。

比較例 7

予め、ポリスチレン製 24 穴マイクロタイタープレート (NUNC (株) 社製) に、Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE 社製) を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から $1200\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射した。実施例 6 に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、ポリエチレン製平板の所定の位置に、3 箇所ずつスポットした。スポットの量は $0.5\mu\text{l}$ ずつであり、スポットの大きさは直径約 1mm であった。照射時間は 480 秒であった。このマイクロタイタープレートを乾燥機に入れ 42°C で 20 分乾燥した。その後、前記マイクロタイタープレートの所定の位置に水を 1ml 加え、30 分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 ($1\times\text{TE}$ 緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

実施例 1 3 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例 1 2 及び比較例 7 のオリゴヌクレオチド固定化マイクロタイタープレートの核酸を固定化した部分に、 3pmol ビオチン化プローブ (262bp) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.)) $100\mu\text{l}$ をのせ、水が浸入しないようにフタをした後、ウォーターバスに沈め、 45°C で 2 時間加熱した。

以下、実施例 2 と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及びマイクロタイタープレートに固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を、次に示す比較例 7 の結果とともに、表 7 に示す。

表 7

	固定化したオリゴヌクレオチド	
	配列番号 1	配列番号 2
実施例 1 2	◎	◎
比較例 7	×	×

表 7 の結果から明らかなように、実施例 1 2 のオリゴヌクレオチド固定化マイクロタイタープレートは、比較例 7 のオリゴヌクレオチド固定化マイクロタイタープレートに比べて、オリゴヌクレオチドが確実にマイクロタイタープレート内に固定化されていることがわかる。また、実施例 1 2 のオリゴヌクレオチド固定化マイクロタイタープレートでは、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。ここで、コントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にはシグナルはまったく現れなかった。

実施例 1 4 核酸のポリスチレンビーズへの固定化

ポリスチレン製ビーズ（大日本インキ化学工業（株）社製、三菱化学（株）社製など）を石英セル内に入れ、実施例 6 に記載のオリゴヌクレオチド溶液をそれぞれ $500\mu\text{l}$ 石英セル内に加えた。次に Uvstratalinker 2400（STRATAGENE 社製）を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から $1200\text{mJ}/\text{cm}^2$ 照射した。照射時間は 480 秒であった。その後、前記ビーズに水を加え、30 分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE 緩衝液）も同様に固定化の操作を行った。

比較例 8

予め、ポリスチレン製ビーズ（大日本インキ化学工業（株）製、三菱化学（株）製など）を石英セル内に入れ、Uvstratalinker 2400（STRATAGENE社製）を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から1200mJ/cm²照射した。照射時間は480秒であった。次いで、実施例6に記載のオリゴヌクレオチド溶液それぞれを、500 μ l石英セル内に加えた。このビーズを石英セルから取り出した後、乾燥機に入れ42℃で20分乾燥した。その後、前記ビーズに水を加え、30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE緩衝液）も同様に固定化の操作を行った。

実施例 15 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例14及び比較例8のオリゴヌクレオチド固定化ビーズに、3pmolピオチン化プローブ（262bp）を含むハイブリダイゼーション溶液（Arrayit UniHyb（TeleChem International, Inc.）100 μ l）を加え、水が浸入しないようにフタをした後、ウォーターバスに沈め、45℃で2時間加熱した。

以下、実施例2と同様にしてポストハイブリダイゼーション、及びビーズに固定化されたオリゴヌクレオチドならびにハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を、次に示す比較例8の結果とともに、表8に示す。

その結果を、次に示す比較例8の結果とともに、表8に示す。配列番号1のオリゴヌクレオチドを固定化したビーズからのシグナルは固定化されたオリゴヌクレオチドの量を、配列番号2のオリゴヌクレオチドを固定化したビーズからのシグナルはハイブリダイゼーションの強度を、それぞれ示す。

表 8

	固定化したオリゴヌクレオチド	
	配列番号 1	配列番号 2
実施例 14	◎	◎
比較例 8	×	×

表 8 の結果から明らかなように、実施例 1 4 のオリゴヌクレオチド固定化ビーズは、比較例 8 のオリゴヌクレオチド固定化ビーズに比べて、オリゴヌクレオチドが確実にビーズ表面に固定化されていることがわかる。また、実施例 1 4 のオリゴヌクレオチド固定化ビーズでは、ハイブリダイゼーションシグナルも明瞭に現れた。ここで、コントロールのビーズ（核酸を含まない溶液に浸したビーズ）にはシグナルはまったく現れなかった。

実施例 1 6 核酸の平板への固定化

常法に従い、配列番号 7 及び 8 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、 λ DNA 断片 (A) を増幅した。得られた断片をアガロース電気泳動し、エチジウムブロマイド染色により検出した結果、その断片の長さは約 300 b であった。また、前記 λ DNA と相補的でない λ DNA 断片 (B) (約 300 b) も同様に増幅した。

市販品のポリカーボネート製の平板の所定の位置に、上記 λ DNA 溶液それぞれを、スプッター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて 3箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約 0.3mm であった。この平板を乾燥機に入れ、42℃で 20分乾燥した。次に Uvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製) を用い、波長 280nm を含む紫外線を 16cm の距離から 600mJ/cm² 照射した。照射時間は 240秒であった。その後、前記平板を水中で 30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE 緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

比較例 9

実施例 1 6 記載の λ DNA 溶液 (濃度 1pmol/ul) それぞれを、ポリカーボネート製の平板の所定の位置に、スプッター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて 3箇所ずつスポットした。この平板を乾燥機に入れ 42℃で 20分乾燥した。その後、前記平板を水中で 30分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE 緩衝液) も同様に平板

にスポットし、固定化の操作を行った。

実施例 17 ハイブリダイゼーション及びその検出

(1) ハイブリダイゼーション

配列番号 7 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドの 5' 末端にビオチンを標識したオリゴヌクレオチド及び配列番号 8 に示す塩基配列を有するオリゴヌクレオチドをプライマーとして、 λ DNA 断片 (C) を増幅した。この λ DNA 断片 (C) の配列は、実施例 16 で作製した λ DNA 断片 (A) の配列と同一である。

実施例 16 及び比較例 9 の λ DNA 固定化平板を 95℃ に暖めた水中に 5 分間浸し、4℃ に冷やした水中に 5 分間浸した。次いで、 λ DNA 固定化平板の核酸を固定化した部分に、前記 1pmol ビオチン化 λ DNA (C) を含むハイブリダイゼーション溶液 (Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60 μ l) をのせ、平板を水が浸入しないケース (ハイブリカセット) に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、60℃ で 2 時間加熱した。

(2) ポストハイブリダイゼーション

上記ハイブリダイゼーションの後、以下の条件でポストハイブリダイゼーション洗浄を行い、 λ DNA 固定化平板に非特異的に吸着したプローブを除去した。

[ポストハイブリダイゼーション洗浄の条件]

- 1) 2 \times SSC, 0.1%SDS; 室温、5 分間、2 回
- 2) 0.2 \times SSC, 0.1%SDS; 40℃、5 分間、2 回
- 3) 2 \times SSC; 室温 1 分間、3 回

(3) ハイブリダイゼーションの検出

平板のハイブリダイゼーション溶液を乗せた部分に、乳タンパクを含むブロッキング溶液 (ブロックエース 雪印乳業製) 1.5ml をのせ、室温で 30 分間ブロッキングを行った。ブロッキング溶液を除いた後、ストレプトアビジン-アルカリホスファターゼコンジュゲート溶液 (VECTOR 社製) を 1.5ml のせ、室温で 30 分間反応させた。つぎに、平板を TBST (50mM Tris-HCl (pH7.5), 0.15M NaCl, 0.05% Tween 20) 溶液に浸し、5 分間振とうして反応しなかったコンジュゲートを除

去した。最後に、平板のハイブリダイゼーション溶液を乗せた部分に基質溶液 (TMB) を1.5mlのせて、30分間放置し、発色反応を行った。

その結果を表9に示す。

表 9

	固定化した核酸	
	λ DNA断片 (A)	λ DNA断片 (B)
実施例 16	◎	×
比較例 9	×	×

表9の結果から明らかなように、ハイブリダイゼーションシグナルが特異的かつ明瞭に現れたことから、実施例16のλDNA断片固定化平板はλDNA断片が確実に平板上に固定化されていることがわかる。一方、比較例9のλDNA断片固定化平板には、シグナルはまったく現れなかった。さらに、実施例16のλDNA断片固定化平板及び比較例9のλDNA断片固定化平板のコントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にもシグナルはまったく現れなかった。

実施例 18 核酸の平板への固定化

市販品のポリメチルメタクリレート製の平板の所定の位置に、実施例16に記載のλDNA溶液それぞれを、スポッター (Pyxis5500 CARTESIAN社製) を用いて3箇所ずつスポットした。スポットの大きさは直径約0.3mmであった。この平板を乾燥機に入れ、42℃で20分乾燥した。次にUvstratalinker 2400 (STRATAGENE社製) を用い、波長280nmを含む紫外線を16cmの距離から1200mJ/cm²照射した。照射時間は480秒であった。その後、前記平板を水中で30分間振とうして洗浄した後、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液 (1×TE緩衝液) も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

比較例 10

実施例 16 記載の λ DNA 溶液（濃度 1 pmol/ul）それぞれを、メタクリレート製の平板の所定の位置に、スポッター（Pyxis 5500 CARTESIAN 社製）を用いて 3 箇所ずつスポットした。この平板を乾燥機に入れ 42℃ で 20 分乾燥した。その後、前記平板を水中で 30 分間振とうして洗浄し、乾燥させた。

一方、コントロールとして核酸を含まない溶液（1×TE 緩衝液）も同様に平板にスポットし、固定化の操作を行った。

実施例 19 ハイブリダイゼーション及びその検出

実施例 18 及び比較例 10 の λ DNA 固定化平板を 95℃ に暖めた水中に 10 分間浸し、4℃ に冷やした水中に 5 分間浸した。次いで、 λ DNA 固定化平板の核酸を固定化した部分に、実施例 17 に記載の 1 pmol ビオチン化 λ DNA (C) を含むハイブリダイゼーション溶液（Arrayit UniHyb (TeleChem International, Inc.) 60 μ l をのせ、平板を水が浸入しないケース（ハイブリカセット）に入れてそのケースごとウォーターバスに沈め、60℃ で 2 時間加熱した。

以下、実施例 17 と同様にしてポストハイブリダイゼーション及びハイブリダイゼーションの検出を行った。その結果を表 10 に示す。

表 10

	固定化した核酸	
	λ DNA 断片 (A)	λ DNA 断片 (B)
実施例 18	◎	×
比較例 10	×	×

表 10 の結果から明らかなように、ハイブリダイゼーションシグナルが特異的かつ明瞭に現れたことから、実施例 18 の λ DNA 断片固定化平板は λ DNA 断片が確実に平板上に固定化されていることがわかる。一方、比較例 10 の λ DNA 断片固

定化平板には、シグナルはまったく現れなかった。さらに、実施例 18 の λ DNA 断片固定化平板及び比較例 10 の λ DNA断片固定化平板のコントロールの位置（核酸を含まない溶液をスポットした箇所）にもシグナルはまったく現れなかった。

産業上の利用の可能性

本発明の方法により、生体分子、例えば核酸、特に鎖長の短い核酸を、合成樹脂製担体に簡便、かつ、効率よく固定することができる。

請求の範囲

1. 生体分子を担体に固定化する方法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を照射する工程を含み、前記担体は合成樹脂製又は天然樹脂製であることを特徴とする方法。

2. 前記合成樹脂は、熱可塑性樹脂、熱硬化性樹脂及び共重合体から選ばれる請求項 1 に記載の方法。

3. 前記合成樹脂が、ポリカーボネート、ポリメチルメタクリレート、アクリロニトリルブタジエンスチレン共重合体、ポリエチレン、ポリエチレンテレフタレート、ポリフェノール、ポリスチレン、ポリアクリロニトリル、ポリ塩化ビニル、及びアラミドから選ばれる請求項 2 に記載の方法。

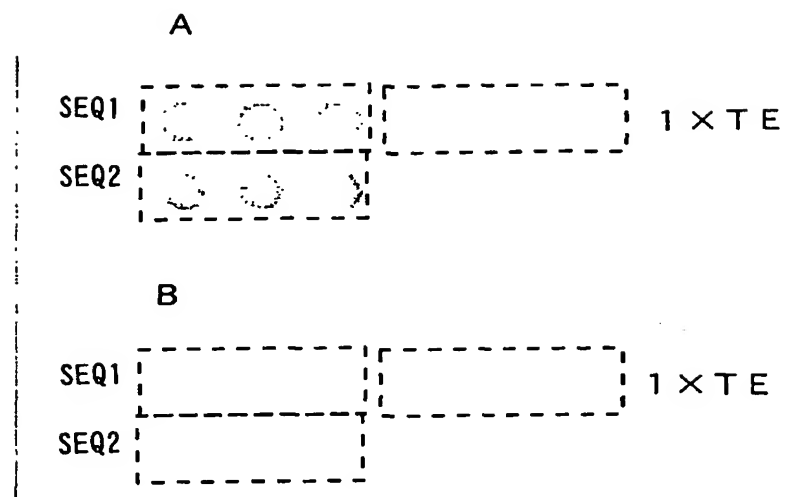
4. 前記紫外線の照射量は $100 \text{ mJ} / \text{cm}^2$ 以上である請求項 1 ～ 3 のいずれか一項に記載の方法。

5. 前記生体分子は核酸、タンパク質、糖、抗原、抗体、ペプチド、酵素から選ばれる請求項 1 ～ 4 のいずれか一項に記載の方法。

6. 生体分子が担体上に固定化された生体分子固定化担体の製造法であって、生体分子の溶液を担体上にスポットする工程と、前記生体分子溶液をスポットした担体に波長 280 nm の成分を含む紫外線を照射し、前記生体分子を担体に固定化する工程を含む方法。

7. 前記生体分子は核酸であって、核酸固定化担体はハイブリダイゼーションによる核酸の分析に用いられるものである請求項 6 に記載の方法。

1/1

*Fig. 1*

SEQUENCE LISTING

<110> Nisshinbo Industries, Inc.

<120> Method for immobilizing biological molecule on substrate

<130> F2037-1441

<140>

<141> 2003-01-31

<150> JP 2002-25622

<151> 2002-02-01

<150> JP 2002-242456

<151> 2002-08-22

<160> 8

<170> PatentIn version 3.0

<210> 1

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture
oligonucleotide

<400> 1

aaatgggtac tgtgcctgtt a

21

<210> 2

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture
oligonucleotide

<400> 2

atgactaccg gcgcgacgat g

21

<210> 3

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: probe DNA

<400> 3

tgcgccgcig tttttgatga ggcggatttt ccggcagttg ccgtttatct caccggcgct 60
gaatacacgg gcgaagagct ggacagcgat acctggcagg cggagctgca tatcgaagtt 120
ttcctgccig ctcaggigcc ggattcagag ctggatgcgt ggatggagtc ccggatttat 180
ccggtgatga gcgatatccc ggcactgtca gatttgatca ccagtatggt ggccagcggc 240
tatgactacc ggcgcgacga tg 262

<210> 4

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture
oligonucleotide

<400> 4

tttttttttt aaatgggtac tgtgcctggt a

31

<210> 5

<211> 31

<212> DNA

<213> Artificial/Unknown

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture
oligonucleotide

<400> 5

tttttttttt atgactaccg gcgcgacgat g

31

<210> 6

<211> 31
<212> DNA
<213> Artificial/Unknown

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture
oligonucleotide

<400> 6
tttttttttt atgactacca gcgcgacgat g

31

<210> 7
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial/Unknown

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture
oligonucleotide

<400> 7
tcgccccgct gtttttgatg a

21

<210> 8
<211> 21
<212> DNA
<213> Artificial/Unknown

<220>

<223> Description of Artificial Sequence: capture
oligonucleotide

<400> 8
catcgtcgcg ccggtagtca t

21

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01006

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12N15/00, C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12N15/00, C12Q1/68

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Jitsuyo Shinan Koho	1922-1996	Toroku Jitsuyo Shinan Koho	1994-2003
Kokai Jitsuyo Shinan Koho	1971-2003	Jitsuyo Shinan Toroku Koho	1996-2003

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JP 2001-136968 A (Mitsubishi Rayon Co., Ltd.), 22 May, 2001 (22.05.01), Par. Nos. [0020], [0027] (Family: none)	1-7
Y	JP 10-104230 A (Aisin Seiki Co., Ltd.), 24 April, 1998 (24.04.98), Par. No. [0049] & DE 019742949 A1	1-7
Y	JP 2001-281246 A (Nisshinbo Industries, Inc.), 10 October, 2001 (10.10.01), Par. No. [0047] & US 2002/0018996 A1	1-7

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search
31 March, 2003 (31.03.03)Date of mailing of the international search report
15 April, 2003 (15.04.03)Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP03/01006

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	JP 2001-83163 A (Fuji Photo Film Co., Ltd.), 30 March, 2001 (30.03.01), Full text; Figs. 1 to 5 (Family: none)	1-7
A	JP 1-242965 A (Shimadzu Corp.), 27 September, 1989 (27.09.89), Full text; Fig. 1 (Family: none)	1-7

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12N15/00, C12Q1/68

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl⁷ G01N33/53, G01N37/00, C12N15/00, C12Q1/68

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

日本国実用新案公報 1922-1996年
 日本国公開実用新案公報 1971-2003年
 日本国登録実用新案公報 1994-2003年
 日本国実用新案登録公報 1996-2003年

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	J P 2001-136968 A (三菱レイヨン株式会社) 2001.05.22、[0020][0027]段落 (ファミリーなし)	1-7
Y	J P 10-104230 A (アイシン精機株式会社) 1998.04.24、[0049]段落 & D E 019742949 A 1	1-7
Y	J P 2001-281246 A (日清紡績株式会社) 2001.10.10、[0047]段落 & U S 2002/0018996 A 1	1-7

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

「A」 特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
 「E」 国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
 「L」 優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
 「O」 口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
 「P」 国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

「T」 国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの

「X」 特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの

「Y」 特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの

「&」 同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

31.03.03

国際調査報告の発送日

15.04.03

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/JP)
 郵便番号 100-8915
 東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

加々美 一恵



2 J

3105

電話番号 03-3581-1101 内線 3250

C (続き) . 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
A	J P 2001-83163 A (富士写真フイルム株式会社) 2001. 03. 30、 全文、第1-5図 (ファミリーなし)	1-7
A	J P 1-242965 A (株式会社島津製作所) 1989. 09. 27、全文、第 1図 (ファミリーなし)	1-7